

氏 名	ごとう さき <b>後藤 紗希</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 624 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>哺乳動物のヘムによる転写調節機構の解明</b>
審 査 委 員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 伊倉宏司

### 論文内容の要旨

あらゆる生物にとって必須のヘムは、ヘムタンパク質の補欠分子族として重要な役割を果たすほか、近年、細胞内の遊離ヘムが遺伝子発現の中核を担う転写因子に結合して遺伝子発現をダイレクトに調節することが報告されるようになり、ヘムの新たな生体機能として注目されている。本研究では、ヘム結合性転写因子のなかでも特に最近になって明らかになってきたヘム結合性核内レセプターについて、ヘムによる核内レセプターの機能制御の網羅的かつ統括的な解析を行い、遺伝子発現調節におけるヘムの生理学的意義を解明することを目的とした。ヘムが脂肪細胞の分化を促進することが報告されているが、その詳細は長年不明であった。これに関連して、申請者は、脂肪細胞分化の制御中枢を担う核内受容体 Retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) のヘム結合性を見出した。そこで、RXR $\alpha$  のヘム結合性に関する生理学的機能を解明するにあたって、ヘムによる脂肪細胞の分化促進系を用いた。RXR $\alpha$  のヘム結合性は、 $K_d = 10^{-8}M$  で比較的高いことを明らかにした。また、変異体 RXR $\alpha$  のヘム結合活性測定の結果から、RXR $\alpha$  のヘム結合部位をリガンド結合部位の 374 番目に位置するシステイン残基 (Cys374) と同定した。Cys374 におけるヘムと RXR $\alpha$  のリガンドとの競合は認められず、また Cys374 は生物種を超えて保存されていたため、RXR $\alpha$  のヘム結合性の重要性が示唆された。ヘムによる脂肪細胞の分化促進に関する報告については再現性が得られず、逆にヘムが脂肪細胞の分化過程を阻害して誘導を抑制することを明らかにした。ヘムによる RXR $\alpha$  の抑制機構としては、ヘムが RXR $\alpha$  の核移行を阻害して転写を抑制することが考えられた。

細胞内の遊離ヘムは活性酸素種を産生して細胞に傷害を与えるため、ヘムの合成と分解は、細胞のヘム要求量に応じて厳密に制御されている。肝細胞におけるヘムの主要な量的制御機構として ヘム合成経路の律速酵素 5'-aminolevulinate synthase 1 (ALAS1) のヘムによる負のフィードバック調節がある。なかでも、ヘムによる ALAS1 遺伝子の転写抑制機構は不明である。これを明らかにするために、マウス ALAS1 遺伝子上流領域について調べたところ、近位プロモーター領域 (-301/-293, 5'-GCGGGGGC-3') がヘム応答配列 (ALAS1 HRE) であることを明らかにした。また、ALAS1 HRE 結合因子はヘム依存的に結合能を増加することから、コリプレッサー複合体であることが示唆された。そこで、ヘムによって誘導され

GC リッチな配列を応答配列とする転写因子 Egr-1 とそのコリプレッサー NAB1/2 の関与を検討した。その結果、ALAS1 HRE 結合因子が Egr-1 および NAB1/2 から構成されヘム依存的に Egr-1-NAB1/2 複合体が ALAS1 HRE に結合することを明らかにした。以上より、細胞内ヘム濃度に応じて、Egr-1-NAB1/2 複合体が ALAS1 遺伝子上流の ALAS1 HRE (-301/-294) に結合して、ALAS1 遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。

あらゆる生物が保有するヘムタンパク質のシトクロム p450 (CYP) は、哺乳動物の肝臓における薬物代謝に重要な役割を果たす。CYP 遺伝子の発現誘導は核内レセプター CAR が転写レベルで制御する。薬物応答時には、CYPへのヘム供給のために ALAS1 遺伝子も発現誘導するが、CAR 依存的であるかは明らかにされていない。また、細胞内のヘム恒常性維持に重要な役割を果たすヘム結合性核内レセプター Rev-erb が薬物代謝において関与することも示唆される。そこで、薬物代謝制御とヘム代謝制御との関係を明らかにするために、ALAS1 遺伝子と Rev-erb 遺伝子の発現に対する薬物応答を調べたところ、*in vivo* において CAR 依存的な ALAS1 mRNA レベルの増加と Rev-erb mRNA の低下が認められた。また、マウスおよびヒトの ALAS1 遺伝子上流 (-17,834/-17,465, -16,469/-15,652) に位置する ADRES が CAR 応答配列であることをヒト肝癌由来 HepG2 細胞で再現性を得た。これらの結果から、CAR と Rev-erb を介する ALAS1 の発現調節機構の存在が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

ヘムタンパク質の補欠分子族のヘムは生命維持のために種々の役割を果たすことが知られているが、その中でも細胞内の遊離ヘムが遺伝子発現の中核を担う転写因子に結合して遺伝子発現を直接調節することが知られる様になりヘムの新たな生体機能として注目されている。本研究では、ヘム結合性転写因子のなかでも生活リズムに関係するヘム結合性核内レセプターについて、ヘムによる核内レセプターの機能制御の網羅的かつ統括的な解析を行い、遺伝子発現調節におけるヘムの生理学的意義の解明をめざした高いレベルの研究として評価した。

1. ヘムが脂肪細胞の分化を促進することが以前に報告されたが、その詳細は長年不明であった。申請者は、脂肪細胞分化の制御中枢を担う核内受容体 Retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) のヘム結合性を見出した。そこで、RXR $\alpha$  のヘム結合性に関する生理学的機能を解明するにあたって、ヘムによる脂肪細胞の分化促進についての役割を調べた。まず RXR $\alpha$  のヘム結合が親和性が比較的高いことを示した。また、変異体 RXR $\alpha$  を作成して、RXR $\alpha$  のヘム結合部位をリガンド結合部位の 374 番目に位置するシステイン残基 (Cys374) と同定した。ヘムによる脂肪細胞の分化促進に関する報告については再現性が得られず、逆にヘムが脂肪細胞の分化過程を阻害して誘導を抑制することを明らかにした。この抑制機構を遺伝子発現レベルで解析してヘム結合による RXR $\alpha$  の機能低下を見いだした。ヘムによる RXR $\alpha$  の抑制機構は、ヘムが RXR $\alpha$  の核移行を阻害することに因ることを、一連の詳細にわたる分子レベルの研究から明らかにしている。従来から定説のように引用されて来たヘムによる脂肪細胞分化の研究を否定した意義のある研究である。
2. 細胞内の遊離ヘムは活性酸素種を產生して細胞に傷害を与えるため、ヘムの合成と分解は、細胞のヘム要求量に応じて厳密に制御されている。細胞におけるヘムの主要な量的制御

機構として ヘム合成経路の律速酵素 5-aminolevulinate synthase 1 (ALAS1) のヘムによる負のフィードバック調節がある。申請者は、ヘムによる ALAS1 遺伝子の転写抑制機構を明らかにするために、マウス ALAS1 遺伝子上流領域について詳細に調べ、近位プロモーター領域 (-301/-293, 5'-GCAGGGGGC-3') がヘム応答配列 (ALAS1 HRE) であることを初めて明らかにした。また、ALAS1 HRE 結合因子はヘム依存的に結合能を増加することから、コリプレッサー複合体として働く因子であると仮定して、ヘムによって誘導され GC リッチな配列を応答配列とする転写因子 Egr-1 とそのコリプレッサー NAB1/2 の関与を明らかにした。また、Egr-1 発現による ALAS1 発現の低下並びに細胞内ヘム含量の現象を発見している。これらの成果は長年不明であった細胞内ヘム濃度の増加による ALAS1 遺伝子の転写を抑制の機構を明らかにしたことで、既に多くの論文で引用されている。また、現在続行中である CAR によるヘム合成促進機構に関する研究は、先駆的研究として評価される。

これらの研究の成果は、下記の国際科学雑誌 3 編（主論文 2；参考論文 1）に掲載されている。

#### 「公表論文」

##### 主論文

1. Gotoh S, Ohgari Y, Nakamura T, Osumi T, Taketani S. Heme-binding to the nuclear receptor retinoid X receptor α (RXRa) leads to the inhibition of the transcriptional activity. *Gene* 423 (2008) 207-214.
2. Gotoh S, Nakamura T, Kataoka T, & Taketani S. Egr-1 regulates the transcriptional repression of mouse δ-aminolevulinic acid synthase 1 by heme. *Gene*. 472 (2011) 28-36.

##### 参考論文

- 1.Ohgari, Y. Miyata, Y., Miyagi, T., Gotoh, S., Ohta, T., Kataoka, T., Furuyama K., and Taketani, S. Roles of porphyrin and iron metabolisms in the d-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photo-damage of tumor cells (2011) *Photochemistry & Photobiology* 87(5): 1138-1145.